

УДК 616.1-092-07

DOI 10.17802/2306-1278-2024-13-3S-173-190

## СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К МОДЕЛИРОВАНИЮ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ И СИСТЕМНОМУ ПОИСКУ ЕЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МАРКЕРОВ

Д.К. Шишкова, А.В. Фролов, В.Е. Маркова, Ю.О. Маркова, А.Ю. Канонькина,  
А.И. Лазебная, В.Г. Матвеева, Е.А. Торгунакова, А.Г. Кутихин

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

### Основные положения

- Моделирование провоспалительной дисфункции эндотелия *in vitro* осуществляется при помощи индукции митохондриально-окислительного стресса (алкилирующий агент митомицин С), лизосомально-кальциевого стресса (кальципротеиновые частицы), цитокинового стресса (добавление липополисахарида) или метаболического стресса (добавление свободных жирных кислот), *in vivo* – при помощи сравнения пожилых и юных лабораторных грызунов, в частности гиперлипидемических мышей.
- Для моделирования вазоспастической дисфункции эндотелия *in vitro* целесообразно использовать ингибиторы эндотелиальной NO-синтазы, для моделирования *in vivo* – крыс с наследственной индуцируемой стрессом артериальной гипертензией, сравнивая их в экспериментах с нормотензивными крысами Wistar.
- Для моделирования протромботической дисфункции эндотелия представляется целесообразным использовать S1-субъединицу Spike-белка вируса SARS-CoV-2 или ее рецептор-связывающий домен (RBD), а также трансгенных мышей K18-hACE2, экспрессирующих человеческий рецептор ACE2.

### Резюме

Несмотря на высокую клиническую актуальность применительно к ряду острых (COVID-19, сепсис, полиорганная недостаточность) и хронических (артериальная гипертензия, синдром старческой астении, тромбоз глубоких вен) состояний и прямое влияние на развитие неблагоприятного исхода, понятие о дисфункции эндотелия остается размытым. С учетом различных пусковых факторов, механизмов развития, молекулярных признаков и патологических последствий целесообразно классифицировать дисфункцию эндотелия как типовой патологический процесс на три вида в зависимости от ведущего звена патогенеза: провоспалительную, вазоспастическую и протромботическую. За исключением гемостатически активных высокомолекулярных мультимеров фактора фон Виллебранда, сопровождающих развитие протромботической дисфункции эндотелия при COVID-19, надежные и клинически применимые циркулирующие маркеры дисфункции эндотелия остаются неизвестными, что существенно осложняет изучение способов ее терапевтической коррекции. В данном обзоре рассматриваются подходы к моделированию указанных вариантов дисфункции эндотелия на клеточных культурах и животных моделях, а также клинические сценарии верификации ее потенциальных маркеров, выявляемых в эксперименте. В качестве модельных триггеров провоспалительной дисфункции эндотелия *in vitro* оптимально использовать митомицин С, кальципротеиновые частицы, липополисахарид и свободные жирные кислоты, вазоспастической дисфункции – ингибиторы эндотелиальной NO-синтазы, протромботической дисфункции – S1-субъединицу Spike-белка SARS-CoV-2 или ее рецептор-связывающий домен. Для моделирования провоспалительной дисфункции эндотелия *in vivo* предлагается использовать митомицин С, вазоспастической дисфункции – крыс с наследственной базальной и индуцируемой стрессом артериальной гипертензией, протромботической дисфункции – внутривенное введение S1-субъединицы или ее рецептор-связывающего домена трансгенным мышам, экспрессирующим человеческий рецептор ACE2 (K18-hACE2).

Для корреспонденции: Дарья Кирилловна Шишкова, shishkovadk@gmail.com; адрес: бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Corresponding author: Daria K. Shishkova, shishkovadk@gmail.com; address: 6, academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Системный поиск маркеров дисфункции эндотелия основывается на поэтапном масс-спектрометрическом профилировании и дот-блот-профилировании (либо мультиплексном иммунофлуоресцентном анализе на основе магнитных микросфер) клеточного секрета (в бессывороточной культуральной среде) и сыворотки крови (после ее фракционирования и удаления высокомолекулярных белков и надмолекулярных комплексов) с последующей верификацией отобранных маркеров методом иммуноферментного анализа.

**Ключевые слова** Эндотелиальные клетки • Дисфункция эндотелия • Циркулирующие маркеры • Масс-спектрометрия • Дот-блот • Мультиплексный анализ • Иммуноферментный анализ

*Поступила в редакцию: 12.08.2024; поступила после доработки: 01.09.2024; принята к печати: 30.09.2024*

## MODELING OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND SEARCH FOR ITS CIRCULATING BIOMARKERS

**D.K. Shishkova, A.V. Frolov, V.E. Markova, Yu.O. Markova, A.Yu. Kanonykina, A.I. Lazebnaya, V.G. Matveeva, E.A. Torgunakova, A.G. Kutikhin**

*Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", 6, academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002*

### Highlights

- Modeling proinflammatory endothelial dysfunction in vitro is achieved by inducing mitochondrial-oxidative stress (alkylating agent mitomycin C), lysosomal-calcium stress (calciprotein particles), cytokine stress (lipopolysaccharide addition), or metabolic stress (palmitic acid addition). In vivo, this can be modeled by comparing aged and young laboratory rodents (specifically hyperlipidemic mice).
- To model vasospastic endothelial dysfunction in vitro, it is advisable to use inhibitors of endothelial NO synthase. For in vivo modeling, rats with stress-induced hereditary arterial hypertension (SIHAH) should be used, comparing them with normotensive Wistar rats in experiments.
- For modeling prothrombotic endothelial dysfunction, it is appropriate to use the S1 subunit of the Spike protein of the SARS-CoV-2 virus or its receptor-binding domain (RBD), as well as transgenic K18-hACE2 mice expressing the human ACE2 receptor.

### Abstract

Despite its high clinical relevance to a range of acute (COVID-19, sepsis, multiple organ failure) and chronic (arterial hypertension, frailty syndrome, deep vein thrombosis) conditions and its direct impact on the development of adverse outcomes, the concept of endothelial dysfunction remains rather vague. Considering the various triggers, development mechanisms, molecular markers, and pathological consequences, it is reasonable to classify endothelial dysfunction as a typical pathological process into three types, determined by the leading pathogenetic factor: proinflammatory, vasospastic, and prothrombotic. Except for the hemostatically active high-molecular-weight multimers of von Willebrand factor accompanying the development of prothrombotic endothelial dysfunction in COVID-19, reliable and clinically applicable circulating markers of endothelial dysfunction remain unknown, significantly complicating the study of therapeutic correction methods. This review discusses approaches to modeling these types of endothelial dysfunction in cell cultures and animal models, as well as clinical scenarios for verifying potential markers identified in experiments. For modeling proinflammatory endothelial dysfunction in vitro, it is optimal to use mitomycin C, calciprotein particles, lipopolysaccharide, and palmitic acid; for vasospastic dysfunction – endothelial NO synthase inhibitors; for prothrombotic dysfunction – the S1 subunit of the SARS-CoV-2 Spike protein or its receptor-binding domain. For modeling proinflammatory endothelial dysfunction in vivo, mitomycin C is proposed; for vasospastic dysfunction – rats with hereditary baseline and stress-induced arterial hypertension; for prothrombotic dysfunction – intravenous administration of the S1 subunit or its receptor-binding domain to transgenic mice expressing the human ACE2 receptor (K18-hACE2). The systematic search for markers of endothelial dysfunction is based on step-by-step mass spectrometric

profiling and dot-blot profiling (or multiplex immunofluorescent assay based on magnetic microspheres) of the cellular secretome (in serum-free culture medium) and blood serum (after fractionation and removal of high-molecular-weight proteins and supramolecular complexes), followed by verification of the selected markers using enzyme-linked immunosorbent assay.

#### Keywords

Endothelial cells • Endothelial dysfunction • Circulating biomarkers • Mass spectrometry • Dot blotting • Multi-analyte profiling technology • Enzyme-linked immunosorbent assay

*Received: 12.08.2024; received in revised form: 01.09.2024; accepted: 30.09.2024*

### Список сокращений

ИЛ – интерлейкин

#### Понятие о дисфункции эндотелия. Виды дисфункции эндотелия. Пусковые факторы, молекулярные признаки и патологические последствия дисфункции эндотелия

Внутренняя выстилка сосудов и клапанов сердца (эндотелий) отвечает за выполнение ряда жизненно важных функций, поддерживая физиологическое течение крови без формирования тромбов, регулируя артериальное давление за счет контролируемого выделения в кровь вазоконстрикторов и вазодилаторов, а также обеспечивая проницаемость внутренней оболочки сосудов (интимы) для ионов и питательных веществ и их непроницаемость для липидов (препятствуя таким образом развитию атеросклероза) [1, 2]. Поддержание эндотелиального гомеостаза в значительной степени зависит от биохимического и клеточного состава циркулирующей крови, поскольку она находится в непосредственном контакте с эндотелием [1, 2]. При метаболических нарушениях (дислипидемии, гипергликемии, азотемии, гиперфосфатемии, гиперкальциемии, развитии острого и хронического системного воспаления), отражающих развитие различных неинфекционных (сахарный диабет, хроническая болезнь почек, гиперпаратиреоз) и инфекционных заболеваний, а также общее старение организма, эндотелий в той или иной степени теряет атромбогенность, способность к выделению большого количества вазодилаторов и целостность межклеточных контактов, а также подвергается провоспалительной активации [3–9]. В совокупности данные нарушения эндотелиального гомеостаза приводят к повышению проницаемости эндотелия, что способствует отложению липидов в интиму, ее инфильтрации моноцитами и постепенному развитию атеросклероза [3–9]. Такая потеря эндотелием своих защитных свойств в научной литературе (в том числе в соответствующих международных рекомендациях) описана термином «дисфункция эндотелия», при которой может преобладать протромботический компонент (иными словами, развивается протромботическая активация эндо-

телия, характерная для среднетяжелого и тяжелого течения COVID-19), вазоспастический компонент (при данном сценарии нарушается эндотелий-зависимая вазодилатация, возрастает общее периферическое сопротивление сосудов и развивается артериальная гипертензия) либо провоспалительный компонент (что сопровождается повышением экспрессии индуцибельных молекул клеточной адгезии на мембране эндотелиальных клеток, активным выделением провоспалительных цитокинов в системный кровоток и развитием острого системного воспаления или хронического стерильного системного воспаления низкой интенсивности) [3–9]. В соответствии с преобладанием того или иного компонента дисфункцию эндотелия разделяют на протромботическую (при среднетяжелом и тяжелом течении COVID-19), вазоспастическую (при артериальной гипертензии) и провоспалительную (при старении организма, хронической болезни почек или сепсисе) [3–9]. Последствиями дисфункции эндотелия являются гипертоническая болезнь, развитие синдрома старческой астении (так называемый инфламэйджинг), а также тромбоз сосудов при тяжелом течении COVID-19 [3–9]. Поскольку в настоящее время средний и медианный возраст населения, а также доля лиц пожилого и старческого возраста в популяции развитых стран (в том числе в РФ) с каждым годом увеличивается, правомерно сделать заключение о возрастающей актуальности дисфункции эндотелия и необходимости поиска ее циркулирующих и клеточных маркеров.

С точки зрения клинической патофизиологии наиболее хорошо изучена протромботическая дисфункция эндотелия, циркулирующий маркер которой был выявлен двумя группами под руководством российских ученых (З.А. Габбасовой и П.В. Авдониной) приблизительно в одно и то же время и независимо друг от друга [10–12]. Исследования данных коллективов показали, что выделяемые эндотелиальными клетками в кровоток нерасщепленные протеазами гемостатически активные высокомолекулярные мультимеры фактора фон

Виллебранда являются чувствительными и специфичными маркерами протромботической дисфункции эндотелия и тромботических осложнений у пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19 [10–12]. Патофизиология вазоспастической дисфункции эндотелия также изучена хорошо, однако все известные методы ее детекции характеризуются существенными недостатками: 1) оценка ответа коронарных артерий на фармакологическую вазодилатацию возможна только при проведении коронарной ангиографии или внутрисосудистого ультразвукового исследования, а аналогичный анализ реакции коронарного микрососудистого русла требует позитронно-эмиссионной томографии или магнитно-резонансной томографии; 2) оценка ответа вен предплечья на фармакологическую вазодилатацию путем плетизмографии (регистрации колебаний объема из-за наполнения кровью) требует канюляции плечевого ствола, а результаты пальцевой плетизмографии после наложения и снятия манжеты для индукции реактивной гиперемии зависят в том числе от не связанных с эндотелием факторов; 3) измерение зависимой от потока вазодилатации путем временного наложения манжеты на плечевого ствола и измерения реактивной гиперемии после ее снятия, а также оценка расширения артерий сетчатки под воздействием мерцающего света достаточно сложны для стандартизации [13]. Несмотря на ряд преимуществ вышеуказанных методик, приведенные недостатки существенно затрудняют объективную оценку вазоспастической дисфункции эндотелия с учетом того, что ее суррогатные биохимические маркеры (к примеру, молярная концентрация нитритов и нитратов, концентрация тетрагидробиоптерина, молярная концентрация L-аргинина, асимметричного и симметричного диметиларгинина в сыворотке крови) не предоставляют возможности верификации собственно дисфункции эндотелия, а лишь отражают нарушения метаболизма монооксида азота (NO) [13]. Наибольшую проблему с точки зрения диагностики представляет провоспалительная дисфункция эндотелия, которая вносит существенный вклад в развитие хронического стерильного системного воспаления низкой интенсивности, в том числе ассоциированного с возрастом (так называемого инфламэйджинга), и, соответственно, в развитие старческой астении [4, 14, 15]. В экспериментах на клеточных культурах провоспалительная активация эндотелия оценивается по повышению выделения в культуральную среду интерлейкина 6 (ИЛ-6), интерлейкина 8 (ИЛ-8) и фактора привлечения моноцитов (MCP-1/CCL2), однако *in vivo* данные цитокины выделяются в системный кровоток целым рядом клеточных популяций, включая различные иммунокомпетентные клетки [7]. Таким образом, несмотря на высокую чувствительность,

указанные провоспалительные молекулы не являются специфичными маркерами дисфункции эндотелия [7]. Большой специфичностью, но меньшей чувствительностью обладают растворимые молекулы клеточной адгезии (sVCAM-1 и sICAM-1), которые проблематично в значительных количествах детектировать в культуральной среде или сыворотке крови [7]. Поиск универсального, чувствительного и специфичного циркулирующего маркера провоспалительной дисфункции эндотелия, подходящего для рутинного определения в клинической лабораторной диагностике, в настоящее время активно ведется в силу высокой и стабильно увеличивающейся распространенности данной патологии вследствие старения населения.

На основании имеющихся к настоящему времени литературных данных можно заключить, что вазоспастическая, провоспалительная и протромботическая дисфункция эндотелия характеризуется различными патологическим фенотипом и наборами вероятных циркулирующих и клеточных маркеров. Поиск циркулирующих маркеров дисфункции эндотелия осуществляется посредством экспериментов *in vitro* (где они выделяются эндотелиальными клетками в культуральную среду) и на лабораторных животных (где они выделяются эндотелием в системный кровоток). Верификация высокочувствительных, но ограниченно специфичных циркулирующих маркеров дисфункции эндотелия выполняется посредством их измерения у пациентов с различными патологиями (старческая астения, COVID-19 среднетяжелого или тяжелого течения, септический шок). В данном обзоре рассмотрены аспекты моделирования различных видов дисфункции эндотелия (провоспалительная, вазоспастическая, протромботическая) и описаны алгоритмы поиска их циркулирующих маркеров. Краткое графическое представление содержания обзора представлено на *рисунке*.

#### **Провоспалительная дисфункция эндотелия: фенотип и маркеры, триггеры для моделирования *in vitro* и *in vivo*, сопоставление с клиническими состояниями, патофизиологические и клинические последствия**

Провоспалительная дисфункция эндотелия является наиболее часто встречаемым видом дисфункции при моделировании *in vitro* и характеризуется комплексом молекулярных изменений, который включает повышение выделения индуцибельных провоспалительных цитокинов (в первую очередь ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP-1/CCL2) и молекул клеточной адгезии (VCAM1, ICAM1 и в меньшей степени E-селектина) в сочетании с повышением экспрессии генов транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*) [7, 16–20]. Прочие наруше-

ния эндотелиального гомеостаза (снижение экспрессии атеропротективных и повышение экспрессии атерогенных транскрипционных факторов, снижение экспрессии эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), нарушение баланса между выделяемыми вазоконстрикторами и вазодилататорами и между выделяемыми протеазами и их ингибиторами) в случае провоспалительной дисфункции эндотелия носят опциональный характер [7, 16–20]. Вероятно, наиболее простым способом детекции провоспалительной дисфункции эндотелия в культуре клеток (то есть приобретения клетками провоспалительного фенотипа) является иммуоферментный анализ на ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP-1/CCL2, при этом концентрации данных цитокинов в культуральной среде при их повышенном выделении дисфункциональными эндотелиальными клетками характеризуются выраженной корреляцией [7, 16–20]. По этой причине не будет неправомерным утверждение о том, что провоспалительная дисфункция эндотелия может определяться повышением любого из указанных маркеров, тем не менее для исключения ложноположительных результатов рекомендуется измерять не менее двух из трех указанных цитокинов.

На клеточных культурах провоспалительная дисфункция эндотелия успешно моделируется при помощи: 1) добавления алкилирующего агента митомицина С, вызывающего митохондриальную дисфункцию и окислительный стресс (в дозировке 500 нг/мл) [21]; 2) искусственно синтезируемых кальципротеиновых частиц, вызывающих лизосо-

мальную дисфункцию и кальциевый стресс (в дозировке 5–10 мкг кальция на 1 мл культуральной среды) [19, 20]; 3) липополисахарида (компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий), стимулирующего выделение провоспалительных цитокинов [22]; 4) загруженной в обезжиренный альбумин пальмитиновой кислоты либо других свободных жирных кислот, вызывающих развитие метаболического стресса (0,8 ммоль/л) [23]. В этом контексте следует отметить, что эндотелий устойчив к воздействию даже супрафизиологических концентраций глюкозы (50 ммоль/л) и собственно провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли альфа в концентрации 20 нг/мл в сочетании с ИЛ-6 в концентрации 100 нг/мл).

Большинство указанных пусковых факторов провоспалительной дисфункции эндотелия в клеточных культурах, однако, не подходят для ее моделирования у лабораторных животных. Добавляемые внутривенно кальципротеиновые частицы быстро выводятся из крови, в значительной степени интернализируясь не артериальными эндотелиальными клетками, а эндотелиальными клетками синусоидных капилляров печени, макрофагами печени и селезенки и моноцитами [19]. Жирные кислоты и глюкоза также быстро утилизируются организмом, не создавая необходимого пролонгированного воздействия на сосудистый эндотелий. Рекомбинантные провоспалительные цитокины слишком дороги для введения лабораторным животным в необходимых количествах, а внутривенное введение липополисахарида вызывает большое количество побочных реакций и не позволяет моделировать изолированную провоспалительную дисфункцию эндотелия. Поэтому для индукции провоспалительной дисфункции эндотелия *in vivo* целесообразно использовать митомицин С (3,5 мг на 1 кг массы тела крысы), который вводится ежедневно в течение недели для достижения выраженного эндотелиального провоспалительного ответа [24, 25]. Следует отметить, что введение митомицина сопряжено с рядом побочных реакций [24, 25], однако они являются последствиями его цитотоксичности, а не индукции системного воспаления, как в случае с липополисахаридом. Адекватным сценарием моделирования также представляется использование животных различного возраста (к примеру, мышей в возрасте от 1 до 12 или даже 18 мес.), при этом животные могут как не иметь сопутствующих патологий, так и характеризоваться врожденным или индуцированным развитием какого-либо типового системного патологического процесса (в частности, дислипидемией, азотемией или гиперфосфатемией). Использование такой модели провоспалительной дисфункции эндотелия основывается на том, что старение организма неизбежно сопровождается развитием хронического стериль-



ного системного воспаления низкой интенсивности (chronic low-grade inflammation), которое является молекулярной основой синдрома старческой астении (frailty) [26–28]. При этом с увеличением возраста доля особей (лабораторных животных) или пациентов с синдромом старческой астении увеличивается, поэтому мыши в возрасте 18 мес. в такой модели будут предпочтительнее мышей в возрасте 12 мес., несмотря на меньший процент мышей, доживающих до этого возраста.

Клинические сценарии провоспалительной дисфункции эндотелия многообразны, однако более или менее изолированной дисфункции эндотелия удастся достичь при развитии старческой астении и при среднетяжелом течении COVID-19 (при этом в последнем случае в зависимости от пациента формируется преимущественно протромботическая, преимущественно провоспалительная дисфункция эндотелия или смешанный ее вариант) [5, 6]. Еще один сценарий выраженной провоспалительной дисфункции эндотелия включает септический шок, однако данная патология характеризуется выраженным системным воспалительным ответом и полиорганной недостаточностью, и нарушения функционирования эндотелия в данном случае не являются даже более или менее изолированными [29]. Вероятнее всего, наиболее точным клиническим сценарием изолированной провоспалительной дисфункции эндотелия является синдром старческой астении, поскольку старение клеток сопровождается развитием соответствующего секреторного фенотипа, выделяемого в отдельную биоинформатическую категорию (senescence-associated secretory phenotype, SASP) [30]. Как и в случае с моделированием провоспалительной дисфункции эндотелия на лабораторных животных, набор пациентов с синдромом старческой астении для изучения данного феномена подразумевает их возможно более пожилой возраст и относительное отсутствие выраженных органических патологий, приводящих к тяжелой инвалидизации или сопутствующих развитию системного воспаления (к примеру, острых инфекционных или хронических инфекционных заболеваний с рецидивирующе-ремиттирующим течением). Преимуществом такого клинического сценария перед среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19 и септическим шоком является возможность набратькратно большее количество пациентов (с учетом обстановки по заболеваемости COVID-19 на момент написания данной обзорной статьи).

Помимо повышенного выделения провоспалительных цитокинов в системный кровоток патофизиологическим последствием провоспалительной дисфункции эндотелия является патологическое повышение эндотелиальной (и, следовательно, сосудистой) проницаемости, способствующее адге-

зии липидов и иммунных клеток к внеклеточному матриксу интимы, ретенции и окислению липидов, развитию воспалительной реакции и созданию условий для последующего атеросклероза [31]. Таким образом, именно провоспалительную дисфункцию эндотелия можно считать обязательной предпосылкой развития атеросклеротической бляшки и таких жизнеугрожающих состояний, как инфаркт миокарда и ишемический инсульт [31]. Аналогичные процессы предшествуют развитию стеноза аортального клапана – приобретенного порока сердца, приводящего к хронической сердечной недостаточности. Поэтому наиболее актуальной провоспалительная дисфункция является для артериального и клапанного эндотелия.

Перспективы изучения циркулирующих маркеров провоспалительной дисфункции эндотелия на данный момент кажутся наибольшими в сравнении с вазоспастической и протромботической дисфункцией. Несмотря на то что текущие чувствительные маркеры дисфункции эндотелия *in vitro* (ИЛ-6, ИЛ-8, MCP-1/CCL2) не являются специфичными для эндотелия и также секретируются и другими клеточными популяциями, существует достаточно значительная вероятность того, что высокопроизводительные протеомные подходы (масс-спектрометрия, дот-блоттинг и мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ на основе магнитных микросфер) позволят найти молекулы, специфично экспрессируемые эндотелием и повышающиеся (либо снижающиеся) при развитии провоспалительной дисфункции эндотелия.

#### **Вазоспастическая дисфункция эндотелия: фенотип и маркеры, триггеры для моделирования *in vitro*, моделирование *in vivo*, сопоставление с клиническими состояниями, патофизиологические и клинические последствия**

Менее ясной с точки зрения определения молекулярных маркеров является вазоспастическая дисфункция эндотелия, преобладающим звеном патогенеза которой является нарушение баланса между выделяемыми вазоконстрикторами (эндотелином 1, ангиотензином II и тромбоксаном A2) и вазодилататорами (NO, простаглицлин, эндотелиальный гиперполяризующий фактор, брадикинин), при этом снижение количества или биодоступности выделяемого NO является обязательным звеном данного вида дисфункции эндотелия [32, 33]. Если в случае провоспалительной дисфункции эндотелия основной проблемой ее диагностики следует считать отсутствие специфичности молекулярных маркеров для эндотелиальных клеток, то препятствием к адекватной диагностике вазоспастической дисфункции эндотелия является отсутствие специфичности соответствующих метаболитов (нитриты и нитраты, тетрагидробиоптерин, L-ар-

гинин, асимметричный и симметричный диметиларгинин) для происходящих в эндотелии процессов, поскольку NO метаболизируют и другие клетки организма (к примеру, макрофаги посредством функционирования индуцибельной NO-синтазы (iNOS), нейроны в результате работы нейрональной NO-синтазы (nNOS) и эритроциты путем экспрессии eNOS) [34, 35]. Наиболее часто вазоспастическая дисфункция эндотелия диагностируется инструментально (посредством сравнительной оценки независимой от функции эндотелия фармакологической вазодилатации и эндотелий-зависимой индуцируемой потоком вазодилатации), однако все варианты данного подхода характеризуются определенными недостатками, главными из которых являются недостаточная стандартизация и техническая сложность [13]. Кроме того, все существующие варианты инструментальной оценки вазоспастической дисфункции эндотелия (описанные выше) позволяют оценить реакцию сосудов исключительно одной локализации и в лучшем случае ограничены одним сосудистым бассейном.

Моделирование вазоспастической дисфункции эндотелия *in vitro* осуществляется путем добавления к культурам клеток соответствующих ингибиторов, среди которых можно выделить гидрохлорид метилового эфира NG-нитро-L-аргинина (L-NAME), дигидрохлорид L-N5-(1-иминоэтил) орнитина и хлорид дифенилениодония, которые проникают через клеточные мембраны и необратимо или медленно обратимо ингибируют активность eNOS и таким образом снижают выработку NO. При этом молекулярный профиль эндотелиальных клеток с вазоспастической дисфункцией также меняется и теоретически может содержать белковые маркеры, уникальные для этого вида дисфункции. Верификация ингибирования биосинтеза NO внутри клетки осуществляется прижизненно посредством инкубации с диацетатом 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлюоресцеина (чувствительным зондом для детекции NO со способностью проникать внутрь клеток). Следует отметить, что надлежащая оценка секреторного профиля эндотелиальных клеток требует не менее 24 ч инкубации конфлюэнтных клеточных культур с флуоресцентным зондом для накопления достаточного количества провоспалительных цитокинов. Для оценки патофизиологических (в том числе молекулярных) особенностей моделирования вазоспастической дисфункции эндотелия представляется целесообразным использовать крыс с наследственной индуцируемой стрессом артериальной гипертензией или крыс со спонтанной артериальной гипертензией (spontaneously hypertensive rats, SHR), сравнивая их с нормотензивными крысами Wistar. Инбредные крысы с наследственной индуцируемой стрессом артериальной гипертензией характеризуются по-

вышенным базальным артериальным давлением (165–175 мм рт. ст. в покое и 190–200 мм рт. ст. при действии стресса), в то время как базальное артериальное давление у крыс линии Wistar не превышает 120 мм рт. ст. [36]. Таким образом, зрелых крыс с наследственной индуцируемой стрессом артериальной гипертензией можно рассматривать как опытную группу при вазоспастической дисфункции эндотелия, а спаренных с ними по полу и возрасту крыс линии Wistar – как контрольную.

Клиническим сценарием вазоспастической дисфункции эндотелия является развитие артериальной гипертензии, вызванной в том числе нарушением баланса между выделяемыми эндотелием вазоконстрикторами и вазодилататорами [37, 38]. При этом остается неизвестным, существуют ли циркулирующие белковые маркеры, позволяющие определить вазоспастическую дисфункцию эндотелия, а также являются ли они специфичными для эндотелия (учитывая метаболизм NO иными распространенными типами клеток – макрофагами, эритроцитами и нейронами) [34, 35]. Важным аспектом, который необходимо учитывать при клинической оценке вазоспастической дисфункции эндотелия, является получаемая пациентами антигипертензивная терапия, поскольку при таком анализе значение будет иметь в первую очередь уровень базального артериального давления пациента, которое относительно стабильно наблюдается в течение дня (без терапии или на фоне принимаемой терапии), а не уровень исходного диагностированного или целевого артериального давления. Для адекватной оценки вазоспастической дисфункции эндотелия необходимо отбирать именно тех пациентов, у которых фармакологическая коррекция артериального давления по тем или иным причинам не проводилась или оказалась недостаточно эффективной, что не позволило достичь целевых значений артериального давления. Вероятнее всего, при отборе таких госпитализированных пациентов необходимо регулярно измерять их артериальное давление – не менее четырех раз за 24 ч перед забором крови (при этом уровень стресса за эти сутки должен быть более или менее объективно контролируемым за счет неизменной обстановки в стационаре). У амбулаторных пациентов такой контроль осуществлять сложно в силу неконтролируемых стрессовых реакций (феномен гипертонии «белого халата»), а также отсутствия даже теоретической возможности надлежащего контроля за стрессовыми реакциями вне больничной палаты.

Единым патофизиологическим последствием вазоспастической дисфункции эндотелия является повышение тонуса сосудов, которое в свою очередь может приводить сразу к нескольким последствиям в зависимости от локализации дисфункционального эндотелия. В случае с артериальным

эндотелием последствием вазоспастической дисфункции эндотелия будет развитие стойкой или увеличение выраженности уже существующей артериальной гипертензии, в случае с микрососудистым эндотелием (в частности в артериолах) – развитие хронической ишемии кровоснабжаемых тканей вследствие продолжительного вазоспазма. В отличие от провоспалительной дисфункции, которая сопровождается повышением сосудистой проницаемости, развитием воспаления в интиме, атерогенезом и формированием неоинтимы (то есть ремоделированием внутренней оболочки артерии), вазоспастическая дисфункция эндотелия способствует развитию ремоделирования мышечной артериальной оболочки (медии). Это обусловлено тем, что устойчивое повышение сосудистого тонуса приводит к изменению сократительного фенотипа сосудистых гладкомышечных клеток на синтетический и, соответственно, усилению синтеза клетками коллагена и протеаз [14, 39–41]. Следствием такого вазоспастического репрограммирования являются деградация эластических волокон (эластолиз) и увеличение доли коллагена в сравнении с эластином, что приводит к повышению артериальной жесткости [14, 39–41]. Аналогичное утверждение, вероятно, справедливо и для артериол, в значительной степени определяющих общее периферическое сопротивление сосудов.

Развитие вазоспастической дисфункции эндотелия, как и провоспалительной, в значительной степени определяется возрастом, поскольку и увеличение артериальной жесткости, и хроническое стерильное системное воспаление низкой интенсивности неизбежно сопровождают старение организма [14, 15, 26–28, 39–41]. Однако у этих двух видов дисфункции есть существенное различие. Развитие возраст-зависимого хронического стерильного системного воспаления низкой интенсивности подразумевает медленное и стабильное прогрессирование возраст-зависимой провоспалительной дисфункции эндотелия, поскольку эндотелиальные клетки сами по себе являются одним из основных источников выделения провоспалительных цитокинов в системный кровоток [14, 15, 26–28]. В то же время возраст-зависимое ремоделирование мышечной оболочки и увеличение сосудистой жесткости в том числе являются следствием вазоспастической дисфункции эндотелия, однако не обязательно свидетельствуют о ее присутствии в настоящем [14, 39–41]. По этой причине возрастные лабораторные животные (к примеру, лабораторные мыши в возрасте 18 мес.) являются подходящей моделью для провоспалительной, но не для вазоспастической дисфункции эндотелия. Моделирование вазоспастической дисфункции эндотелия требует постоянно повышенного артериального давления в течение не менее 24 ч до момента забора крови. С

целью дифференцировки провоспалительной и вазоспастической дисфункции эндотелия *in vivo* (на лабораторных животных и в клинических сценариях) целесообразно изучать провоспалительную дисфункцию в пожилом и старческом возрасте (сравнивая с юным или молодым возрастом), а вазоспастическую дисфункцию – в молодом или зрелом возрасте (сравнивая лабораторных животных или пациентов в одном и том же возрасте с изолированной артериальной гипертензией и без нее). К примеру, при моделировании провоспалительной дисфункции эндотелия можно использовать гиперлипидемических ApoE-нокаутных мышей в возрасте 18 (опытная группа) и 3 (контрольная группа) мес., при моделировании вазоспастической дисфункции эндотелия – крыс с наследственной индуцируемой стрессом артериальной гипертензией или линии SHR в возрасте 6 мес. (опытная группа) и крыс линии Wistar в этом же возрасте (контрольная группа) с учетом идентичного пола опытных и контрольных животных.

#### **Протромботическая дисфункция эндотелия: фенотип и маркеры, триггеры для моделирования *in vitro*, моделирование *in vivo*, сопоставление с клиническими состояниями, патофизиологические и клинические последствия**

Принципиальным отличием протромботической дисфункции эндотелия от провоспалительной и вазоспастической является нарушение баланса между функционированием гемостатических и антитромботических молекул, повышающее риск развития тромбоза [6, 42–44]. Протромботическая дисфункция эндотелия характеризуется повышенным выделением нерасщепленных протеазами и гемостатически активных высокомолекулярных мультимеров фактора фон Виллебранда, одного из основных ингибиторов фибринолиза ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) и растворимой формы рецептора урокиназного активатора плазминогена (uPAR) эндотелиальными клетками [6, 10–12, 42–44]. Хотя протромботическая дисфункция эндотелия в некоторых случаях сопровождается провоспалительной (к примеру, при COVID-19), эксперименты по моделированию провоспалительной дисфункции эндотелия на клеточных культурах показали, что повышение выделения эндотелиальными клетками провоспалительных цитокинов далеко не всегда сопровождается аналогичными изменениями секреции обильно выделяемых эндотелием PAI-1 и uPAR. Учитывая высокую клиническую актуальность именно тромботических, а не воспалительных последствий острой (при COVID-19) и хронической (при тромбозе глубоких и поверхностных вен) дисфункции эндотелия, представляется целесообразным вынести протромботическую дисфункцию эндотелия в отдельный подвид [6, 42–44].

На клеточных культурах протромботическая дисфункция эндотелия моделируется путем добавления S1-субъединицы Spike-белка коронавируса SARS-CoV-2 либо рецептор-связывающего домена (RBD) указанной субъединицы в дозировке от 1 до 10 мкг/мл [45, 46]. Для моделирования протромботической дисфункции на лабораторных животных применяются трансгенные мыши K18-hACE2, экспрессирующие человеческий рецептор ACE2 для обеспечения надлежащей аффинности S1-субъединицы или рецептор-связывающего домена после ее внутривенного введения (предпочтительной системой для синтеза которых являются линии эукариотических, а не прокариотических клеток) [47, 48]. Патологическим последствием протромботической дисфункции эндотелия служат приводящие к формированию тромбов нарушения эндотелиального звена гемостаза, клиническими последствиями – венозный тромбоз с риском тромбоэмболии легочной артерии либо тромбоз артерий при COVID-19 [5, 6, 42–44].

Проблемой детекции циркулирующих маркеров протромботической дисфункции эндотелия является ее неотъемлемая связь с провоспалительной дисфункцией, поскольку сосудистый тромбоз неизбежно связан с воспалением в сосудистой стенке. Кроме того, в клинических сценариях протромботической дисфункции эндотелия пациенты с большой долей вероятности уже страдают от тромботических осложнений, поэтому циркулирующие маркеры могут отражать скорее случившийся тромбоз мелких сосудистых ветвей, чем риск тромбоза в результате эндотелиальной дисфункции. На данный момент наиболее надежным и специфичным циркулирующим маркером протромботической дисфункции эндотелия следует считать высокомолекулярные мультимеры фактора фон Виллебранда, поскольку данная форма этого гликопротеина непосредственно находится в тельцах Вайбеля – Паладе в цитоплазме эндотелиоцитов [10–12]. Помимо эндотелиоцитов фактор фон Виллебранда также синтезируется в мегакариоцитах костного мозга и присутствует в субэндотелиальном слое, однако подавляющее большинство его протромботических высокомолекулярных мультимеров синтезируется именно эндотелиальными клетками [10–12]. Кроме того, фактор фон Виллебранда напрямую не связан с развитием провоспалительной или вазоспастической дисфункции, что делает его специфичным именно для протромботической дисфункции эндотелия [10–12]. Вместе с тем остается не вполне ясной роль циркулирующих высокомолекулярных мультимеров фактора фон Виллебранда при тромбозе вен нижних конечностей, при котором протромботическая дисфункция эндотелия развивается постепенно и носит хронический характер в отличие от стремительного развития

при COVID-19 [10–12, 42–44]. Учитывая высокую распространенность тромбоза вен нижних конечностей и его зависимость от протромботической дисфункции эндотелия, валидация высокомолекулярных мультимеров фактора фон Виллебранда как маркера ее развития у данной категории пациентов может иметь высокую клиническую значимость.

#### **Феномен адаптационной устойчивости к развитию дисфункции эндотелия (endothelial resilience) в контексте гетерогенности эндотелиальных клеток и в регенеративном контексте**

Как и в случае с иными типовыми патологическими процессами, изучение дисфункции эндотелия подразумевает исследование феномена адаптационной устойчивости к ее развитию (который в англоязычной литературе обозначается как endothelial resilience) [49, 50]. Адаптационную устойчивость эндотелиальных клеток к повреждающим факторам можно определить как их способность сохранять жизнеспособность, пролиферативную и ангиогенную активность под воздействием пусковых факторов дисфункции [49, 50]. Наиболее ярко этот феномен проявляется *in vitro*, где доля гибнущих клеток и степень провоспалительной активации существенно зависят от метаболических и пролиферативных особенностей самой культуры даже при сравнении различных эндотелиальных дифферонов от одного и того же донора. Различные культуры от одного и того же донора могут иметь различную адаптационную устойчивость к воздействию одних и тех же триггеров дисфункции эндотелия, как и культуры одного и того же вида клеток, полученные от разных доноров. При этом состояние каждой из культур (в первую очередь степень клеточного старения) зависит от объема изначального материала для выделения, количества исходно выделенных эндотелиальных клеток (в особенности с высокой пролиферативной активностью), требуемого для эксперимента количества пассажей и необходимого для достижения конфлюэнтного монослоя количества делений. Остается не вполне ясным, насколько в культурах клеток сохраняется исходная молекулярная гетерогенность эндотелиальных клеток, определяемая параметрами потока в артериях, венах и различных сосудах микроциркуляторного русла. Еще более неясно, определяет ли эта гетерогенность различия в адаптационной устойчивости эндотелиальных клеток к развитию дисфункции эндотелия или они обусловлены исключительно вышеуказанными особенностями выделения культур из различных источников.

Среди основных параметров физиологии эндотелия для оценки его адаптационной устойчивости к внешнему воздействию в опытных и контрольной группах целесообразно сравнивать: 1) пролиферативную активность, которая оценивается по

способности эндотелиальных клеток заполнять предварительно собранный стандартизированный между всеми экспериментальными группами и геометрически правильный дефект (scratch assay); 2) ангиогенную активность, которая оценивается по способности эндотелиальных клеток формировать трубчатые капилляроподобные структуры в трехмерном геле из белков базальной мембраны; 3) профиль геной экспрессии, в первую очередь экспрессии генов индуцибельных и конститутивных провоспалительных цитокинов (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*), молекул клеточной адгезии (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*), транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*), синтеза NO (*NOS3*), про- и антитромботических молекул (*SERPINE1*, *VWF*, *PLAU*, *PLAT*); 4) концентрацию по меньшей мере одного из трех провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8, MCP-1/CCL2). В подобном дизайне исследования более устойчивые клетки, возможно, будут более близки по вышеуказанным параметрам к контрольной культуре. Оценка адаптационной устойчивости эндотелия к пусковым факторам его дисфункции имеет большой потенциал применительно к регенеративной медицине, поскольку клеточная терапия или аутологичные тканеинженерные медицинские изделия в подавляющем большинстве случаев применяются именно у пациентов с коморбидными состояниями, потенциально способными снижать регенеративный потенциал эндотелиальных клеток. Поэтому предварительная оценка способности эндотелия выдерживать воздействие повреждающих факторов может играть значительную роль в оценке его регенеративного потенциала в реальных условиях.

#### **Методология расшифровки молекулярных профилей и системный поиск молекулярных маркеров дисфункции эндотелия**

Внедрение в научно-исследовательскую практику современных высокопроизводительных технологий позволяет осуществлять системный поиск циркулирующих маркеров дисфункции эндотелия для ее своевременной идентификации и предотвращения развития соответствующих клинических проявлений. Подобное исследование предусматривает несколько этапов, на первом из которых необходимо определить профили белков, выделяемых эндотелиальными клетками под воздействием пусковых факторов дисфункции эндотелия в культуральную среду. С учетом исходной молекулярной гетерогенности эндотелия, а также метаболических и пролиферативных особенностей эндотелиальных клеток от различных источников и различных доноров разумным представляется сравнение артериальных, венозных, микрососудистых и клапанных эндотелиальных клеток. Ключевым аспектом та-

кого выбора групп является то, что артериальные, венозные и микрососудистые эндотелиальные клетки могут быть получены прижизненно из одного и того же источника в процессе коронарного шунтирования (сегмент левой или правой внутренней грудной артерии, сегмент большой подкожной вены, подкожная и/или эпикардиальная и околососудистая жировая ткань), что является идеальным вариантом для последующего изучения «истинной» молекулярной гетерогенности эндотелия (базальной, то есть проявляющейся вне зависимости от воздействия потока или пусковых факторов дисфункции эндотелия). В свою очередь клапанные эндотелиальные клетки также выделяются прижизненно при операциях по поводу аортального стеноза и имеют изначальные отличия от сосудистых вследствие иных гемодинамических характеристик в позиции аортального клапана. Если основной гемодинамической силой применительно к сосудистым эндотелиальным клеткам является напряжение сдвига (shear stress), то клапанные эндотелиальные клетки подвергаются воздействию и других биомеханических сил вследствие создания завихрений в области клапана и прямого гемодинамического удара в период систолы.

Из иных типов эндотелиальных клеток в первую очередь следует выделить лимфатические эндотелиальные клетки, которые проблемно сравнивать с сосудистыми вследствие несовпадения маршрутизации соответствующих пациентов: как правило, лимфоузлы для выделения лимфатических эндотелиальных клеток можно получить лишь при выполнении хирургических вмешательств у онкологических больных. При этом эндотелиальные клетки сосудов опухолей изначально подвергаются воздействию нетипичного для остальных сосудов микроокружения и поэтому не являются адекватным представителем сосудистых эндотелиальных клеток в контексте моделирования их дисфункции. Не менее важным молекулярным аспектом функционирования лимфатических эндотелиальных клеток остается то, что ведущим фактором их роста наряду с VEGF-A также является VEGF-C, в значительной степени оказывающий действие через VEGFR3 и таким образом стимулирующий формирование лимфатических сосудов. Иными словами, если для ангиогенеза основной является сигнальная ось VEGF-A/VEGFR2, то для лимфангиогенеза – VEGF-C/VEGFR3. Поскольку среды для культивирования эндотелиальных клеток содержат именно VEGF-A, то добавление VEGF-C для сохранения идентичных условий культивирования приведет к неизбежным изменениям в молекулярном профиле культивируемых с ним сосудистых эндотелиальных клеток вне зависимости от их исходного фенотипа. Культивирование же сосудистых эндотелиальных клеток с VEGF-A, а лимфатических – с VEGF-A и

VEGF-C очевидно приведет к несоблюдению принципа одинаковых исходных экспериментальных условий. Подводя итог оценке необходимости сравнения гетерогенности и принципов развития дисфункции сосудистого и лимфатического эндотелия, следует отметить принципиально разные области медицины, для которых это имеет патофизиологическую и клиническую актуальность. Если дисфункция всех видов сосудистого эндотелия, а также эндотелия клапанов сердца в первую очередь имеет отношение к кардиологии (хотя провоспалительная и протромботическая дисфункция сосудистого эндотелия, вероятно, также может встречаться у онкологических больных), то дисфункция лимфатического эндотелия будет иметь приоритетное значение для развития злокачественных опухолей (поскольку лимфатические сосуды являются одним из основных путей метастазирования) и инфекционных болезней (так как лимфостаз является одним из факторов распространения некоторых инфекций).

Обсуждая необходимые для анализа пусковые факторы дисфункции эндотелия, в первую очередь следует выделить те из них, которые запускают различные механизмы провоспалительной дисфункции эндотелия. В этом контексте внимание обращают четыре из них: 1) митомицин С, вызывающий митохондриально-окислительный стресс; 2) кальципротеиновые частицы, вызывающие лизосомально-кальциевый стресс; 3) свободные жирные кислоты, вызывающие сочетанный метаболический стресс (в особенности насыщенные жирные кислоты, к примеру пальмитиновая кислота); 4) липополисахарид, вызывающий цитокиновый стресс. Несмотря на то что все данные пусковые факторы дисфункции эндотелия запускают различные сигнальные каскады, итогом их активации становится повышенное выделение провоспалительных цитокинов в системный кровоток и увеличение экспрессии молекул клеточной адгезии, способствующих прикреплению моноцитов к эндотелиальным клеткам. Анализ различных механизмов запуска провоспалительной дисфункции эндотелия представляется целесообразным проводить по причине их вероятного соответствия воздействию различных коморбидных факторов с целью оценки всех возможных патогенетических сценариев. Для подбора оптимальных дозировок пусковых факторов провоспалительной дисфункции эндотелия (поскольку их содержание в культуральной среде напрямую коррелирует с интенсивностью клеточной гибели) представляется разумным использовать тест на определение интенсивности клеточного метаболизма (ошибочно называемый тестом на оценку пролиферации и жизнеспособности), к примеру WST-1 (основанный на добавлении к клеточным культурам водорастворимых тетразолиевых солей и их восстановлении до водорастворимого форма-

зана митохондриальными дегидрогеназами), а также оценку посредством биоимпедансометрии или фазово-контрастной микроскопии. Эффекты возрастающих доз митомицина С предварительно оцениваются путем инкубации эндотелиальных клеток с флюорогенными молекулярными детекторами активных форм кислорода MitoSOX (супероксид) и CellROX (активные формы кислорода в целом), эффекты кальципротеиновых частиц – посредством оценки уровня кальция в цитозоле при помощи флюорогенных молекулярных зондов (Fluo-4 AM и FluoCa-8 AM, проникающих в клетки и метаболизируемых клеточными эстеразами) и конфокальной микроскопии. Итоговая эффективность провоспалительной активации эндотелия может быть оценена посредством измерения ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP-1/CCL2 методом иммуноферментного анализа.

Во вторую очередь сравнения могут быть включены пусковые факторы провоспалительной, вазоспастической и протромботической дисфункции эндотелия для сопоставления молекулярных профилей указанных вариантов этого типового патологического процесса. Для оценки эффективности воздействия триггеров вазоспастической дисфункции эндотелия целесообразно провести предварительный скрининг эффективности возрастающих концентраций проникающих через клеточные мембраны и необратимых или медленно обратимых ингибиторов eNOS – гидрохлорида метилового эфира NG-нитро-L-аргинина (L-NAME), дигидрохлорида L-N5-(1-иминоэтил)орнитина и хлорида дифенилениодония путем инкубации с диацетатом 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлюоресцеина в течение 24 ч с последующей детекцией отсутствия NO при помощи конфокальной микроскопии в многоруночных оптически прозрачных культуральных камерах. Непосредственный молекулярный анализ данных, собранных в результате первой и второй очереди сравнения эффектов различных пусковых факторов дисфункции эндотелия, может быть проведен при помощи: 1) сочетанной оценки изменений генной экспрессии в самих эндотелиальных клетках (методом количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции выделенной из клеточного лизата РНК, поскольку именно он позволяет провести наиболее широкий, быстрый и дешевый скрининг молекулярного ответа на патологическое воздействие; 2) масс-спектрометрического анализа как чувствительного скринингового метода анализа клеточного секрета; 3) дот-блоттинга либо мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа на основе магнитных микросфер как скрининговых и вместе с этим специфичных методов полуколичественного (дот-блот) и количественного (микросферы) анализа выделяемых в культуральную среду белков; 4) иммуноферментного анализа как верификацион-

ного метода количественного белкового анализа. Следует отметить, что именно результаты первого этапа исследования, проведенного на клеточных культурах, очерчивают набор белковых маркеров, который далее предлагается к проверке при моделировании дисфункции эндотелия на лабораторных животных и в клинических сценариях.

Моделирование провоспалительной, вазоспастической и протромботической дисфункции эндотелия *in vivo* (на лабораторных животных) более подробно описано в другой статье этого номера и является необходимым вторым этапом, сужающим спектр вероятных циркулирующих маркеров от широкого (набор дифференциально экспрессируемых белков после патологического воздействия триггеров дисфункции эндотелия на клеточные культуры) до среднего (совокупность дифференциально экспрессируемых белков, детектируемых в сыворотке крови при сравнении животных с модельной дисфункцией эндотелия и контрольных животных). Методами оценки индуцированной *in vivo* дисфункции эндотелия при этом также служат масс-спектрометрический анализ, дот-блот-профилирование, мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ на основе магнитных микросфер и иммуноферментный анализ сыворотки крови. Важным методологическим аспектом этого этапа исследования является необходимость предварительного обогащения сыворотки крови путем ультрафильтрации через поры диаметром не более 30 кДа с целью исключения наиболее часто встречающихся высокомолекулярных белков. При этом для масс-спектрометрического анализа данный экспериментальный прием является обязательным, а для дот-блот-профилирования, мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа на основе магнитных микросфер и иммуноферментного анализа – опциональным. Тем не менее обогащение образца сыворотки крови низкомолекулярными белками за счет удаления высокомолекулярных белков и надмолекулярных комплексов может быть полезным для объективного количественного анализа циркулирующих маркеров с низкой экспрессией, в частности некоторых провоспалительных цитокинов.

Наконец, последним этапом системного поиска циркулирующих маркеров дисфункции эндотелия является анализ сыворотки крови пациентов с различными модельными патологиями: молодых субъектов и пациентов со старческой астенией для моделирования провоспалительной дисфункции эндотелия, пациентов с изолированной артериальной гипертензией для моделирования вазоспастической дисфункции эндотелия и больных со средне-тяжелой формой COVID-19 и тромбозом глубоких вен для моделирования протромботической дисфункции эндотелия. Методология поиска циркулирующих маркеров при этом полностью совпадает

со вторым этапом (поскольку анализируется один и тот же тип биологического образца). Однако в силу высокой стоимости масс-спектрометрического анализа, дот-блот-профилирования и мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа на основе магнитных микросфер представляется разумным подбор пациентов с максимально различающимся в экспериментальных группах фенотипом. Важным следует считать проведение эксперимента по сокультивированию плазмы крови и эндотелиальных клеток от одного и того же пациента, при этом в качестве модельной культуры целесообразно использовать колониеформирующие эндотелиальные клетки периферической венозной крови, получаемые в результате продолжительной инкубации мононуклеарной фракции на подложке из белков эндотелиальной базальной мембраны (фибронектин или желатин) в питательной среде для культивирования эндотелиальных клеток, обогащенной фактором роста сосудистого эндотелия (VEGF). Проблемой является низкая эффективность процесса выделения колониеформирующих эндотелиальных клеток, которая превышает 25% лишь при культивировании мононуклеарной фракции от пациентов непосредственно после внутрисосудистых вмешательств (к примеру, чрескожного коронарного вмешательства). Тем не менее такой дизайн исследования позволяет избежать гибели эндотелиальных клеток в результате воздействия гуморальных факторов плазмы (к примеру, компонентов комплемента) и сравнить профили цитокинов: 1) выделяемых в бессывороточную культуральную среду чистой культурой эндотелиальных клеток от этого же донора; 2) содержащихся в сыворотке крови донора изначально, до ее инкубации с культурой эндотелиальных клеток; 3) добавившихся в сыворотку крови после ее инкубации с культурой эндотелиальных клеток. При этом сыворотка крови изначально может быть получена от асимптоматичных пациентов или от пациентов с вышеуказанными патологическими состояниями, а также с септическим шоком (как пусковой фактор острой провоспалительной дисфункции эндотелия). С помощью такого подхода и его сочетания с дот-блот-профилированием, мультиплексным иммунофлуоресцентным анализом на основе магнитных микросфер и масс-спектрометрическим анализом можно выделить именно те цитокины, которые выделяются в системный кровоток эндотелием и изначально отсутствуют или присутствуют в сыворотке крови в малом количестве.

Итогом такого исследования должна стать идентификация циркулирующего маркера всех видов дисфункции эндотелия, который можно определять в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа и который будет обладать достаточной диагностической ценностью (чувствительностью и

специфичностью) у различных категорий больных. Требования к такому белковому маркеру включают:

1. наличие его в эндотелиальном секрете (то есть доказанная и стабильная секреция данного белка-маркера эндотелиальными клетками в их микроокружение и системный кровоток);

2. высокую чувствительность, определяемую как: 1) способность детектировать повышение данного маркера при помощи масс-спектрометрического анализа, дот-блот-профилирования, мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа на основе магнитных микросфер или иммуноферментного анализа различными типами эндотелиальных клеток и их культурами от различных доноров при воздействии широкого спектра пусковых факторов дисфункции эндотелия; 2) способность детектировать повышение данного маркера при помощи масс-спектрометрического анализа, дот-блот-профилирования, мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа на основе магнитных микросфер и иммуноферментного анализа в сыворотке крови лабораторных животных при моделировании дисфункции эндотелия; 3) возможность стабильной детекции указанного маркера в сыворотке крови в пределах средних значений калибровочной кривой при иммуноферментном анализе у различных категорий пациентов;

3. высокую специфичность, определяемую как отсутствие выделения иными клеточными популяциями и как отсутствие либо ничтожно малую концентрацию данного маркера в циркулирующей крови при измерениях методами масс-спектрометрического анализа, дот-блот-профилирования, мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа на основе магнитных микросфер и иммуноферментного анализа.

Идентификация циркулирующих маркеров дисфункции эндотелия, вероятно, позволит осуществлять адекватный поиск способов ее терапевтической коррекции и управления состоянием эндотелия не только при хронических, но и острых патологиях. Внедрение современных протеомных

технологий в научно-исследовательскую практику (в первую очередь в центрах коллективного пользования), а также разработка отечественных наборов для дот-блот-профилирования и мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа на основе магнитных микросфер (аналога технологии xMAP – Multi-Analyte Profiling) с большой долей вероятности будут способствовать успешному поиску вышеуказанных маркеров за счет повышения доступности и снижения стоимости проведения подобных многоэтапных исследований.

### Конфликт интересов

Д.К. Шишкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Фролов заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Е. Маркова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Ю.О. Маркова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Ю. Каноныкина заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.И. Лазебная заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Г. Матвеева заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.А. Торгунакова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Г. Кутихин входит в редакционную коллегию журнала «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний».

### Финансирование

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 24-65-00039 «Идентификация циркулирующего маркера провоспалительной дисфункции эндотелия в контексте гетерогенности эндотелиальных клеток», <https://rscf.ru/project/24-65-00039/>.

### Funding

This research was funded by the Russian Science Foundation, grant number 24-65-00039 “Identification of circulating endothelial dysfunction marker in context of endothelial heterogeneity” (Daria Shishkova), <https://rscf.ru/project/24-65-00039/>.

### Информация об авторах

*Шишкова Дарья Кирилловна*, кандидат биологических наук заведующая лабораторией молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1518-3888

*Фролов Алексей Витальевич*, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории рентгенэндоваскулярной и реконструктивной хирургии сердца и сосудов отдела хирургии сердца и сосудов федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1746-8895

### Author Information Form

*Shishkova Daria K.*, PhD, Head of the Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1518-3888

*Frolov Alexey V.*, MD, DSc, Senior Researcher, Laboratory for Endovascular and Reconstructive Cardiovascular Surgery, Department of Cardiovascular Surgery, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1746-8895

*Маркова Виктория Евгеньевна*, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-6652-5745

*Маркова Юлия Олеговна*, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0007-6734-3787

*Канонькина Анастасия Юрьевна*, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-2810-3100

*Лазебная Анастасия Ивановна*, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1867-6354

*Матвеева Вера Геннадьевна*, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4146-3373

*Торгунакова Евгения Александровна*, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0005-0683-991X

*Кутихин Антон Геннадьевич*, доктор медицинских наук заведующий отделом экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

*Markova Victoria E.*, MSc, Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-6652-5745

*Markova Yulia O.*, MSc, Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0009-0007-6734-3787

*Kanonykina Anastasia Yu.*, MSc, Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-2810-3100

*Lazebnaya Anastasia I.*, MSc, Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1867-6354

*Matveeva Vera G.*, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Cell and Tissue Engineering, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4146-3373

*Torgunakova Evgenia A.*, MSc, Junior Researcher, Laboratory for Cell and Tissue Engineering, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0009-0005-0683-991X

*Kutikhin Anton G.*, MD, DSc, Head of the Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

#### Вклад авторов в статью

*ШДК* – интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*ФАВ* – интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*МВЕ* – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*МЮО* – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*КАЮ* – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

#### Author Contribution Statement

*ShDK* – data interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

*FAV* – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

*MVE* – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

*MYuO* – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

*KAYu* – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

*ЛАИ* – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*МВГ* – интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*ТЕА* – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*КАГ* – интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*LAI* – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

*MVG* – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

*TEA* – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

*KAG* – data interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cahill P.A., Redmond E.M. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016;248:97-109. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.
- Trimm E., Red-Horse K. Vascular endothelial cell development and diversity. *Nat Rev Cardiol*. 2023;20(3):197-210. doi: 10.1038/s41569-022-00770-1.
- Gimbrone M.A.Jr., García-Cardeña .G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
- Ungvari Z., Tarantini S., Kiss T., Wren J.D., Giles C.B., Griffin C.T., Murfee W.L., Pacher P., Csiszar A. Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(9):555-565. doi: 10.1038/s41569-018-0030-z.
- Evans P.C., Rainger G.E., Mason J.C., Guzik T.J., Osto E., Stamataki Z., Neil D., Hofer I.E., Fragiadaki M., Waltenberger J., Weber C., Bochaton-Piallat M.L., Bäck M. Endothelial dysfunction in COVID-19: a position paper of the ESC Working Group for Atherosclerosis and Vascular Biology, and the ESC Council of Basic Cardiovascular Science. *Cardiovasc Res*. 2020;116(14):2177-2184. doi: 10.1093/cvr/cvaa230.
- Bonaventura A., Vecchié A., Dagna L., Martinod K., Dixon D.L., Van Tassel B.W., Dentali F., Montecucco F., Massberg S., Levi M., Abbate A. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(5):319-329. doi: 10.1038/s41577-021-00536-9.
- Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Velikanova E.A., Sinitsky M.Y., Sinitskaya A.V., Markova V.E. Endothelial Dysfunction in the Context of Blood-Brain Barrier Modeling. *J Evol Biochem Physiol*. 2022;58(3):781-806. doi: 10.1134/S0022093022030139.
- Segers V.F.M., Bringmans T., De Keulenaer G.W. Endothelial dysfunction at the cellular level in three dimensions: severity, acuteness, and distribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2023;325(2):H398-H413. doi: 10.1152/ajpheart.00256.2023.
- Baaten C.C.F.M.J., Vondenhoff S., Noels H. Endothelial Cell Dysfunction and Increased Cardiovascular Risk in Patients With Chronic Kidney Disease. *Circ Res*. 2023;132(8):970-992. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.321752.
- Kozlov S., Okhota S., Avtaeva Y., Melnikov I., Matroze E., Gabbasov Z. Von Willebrand factor in diagnostics and treatment of cardiovascular disease: Recent advances and prospects. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:1038030. doi: 10.3389/fcvm.2022.1038030.
- Okhota S., Melnikov I., Avtaeva Y., Kozlov S., Gabbasov Z. Shear Stress-Induced Activation of von Willebrand Factor and Cardiovascular Pathology. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):7804. doi: 10.3390/ijms21207804.
- Авдонин П.П., Цветаева Н.В., Гончаров Н.В., Рыбакова Е.Ю., Труфанов С.К., Цитрина А.А., Авдонин П.В. Фактор Виллебранда в норме и при патологии. Биологические мембраны. 2021;38(4):237-256. doi: 10.31857/S0233475521040034.
- Alexander Y., Osto E., Schmidt-Trucksäss A., Shechter M., Trifunovic D., Duncker D.J., Aboyans V., Bäck M., Badimon L., Cosentino F., De Carlo M., Dorobantu M., Harrison D.G., Guzik T.J., Hofer I., Morris P.D., Norata G.D., Suades R., Taddei S., Vilahur G., Waltenberger J., Weber C., Wilkinson F., Bochaton-Piallat M.L., Evans P.C. Endothelial function in cardiovascular medicine: a consensus paper of the European Society of Cardiology Working Groups on Atherosclerosis and Vascular Biology, Aorta and Peripheral Vascular Diseases, Coronary Pathophysiology and Microcirculation, and Thrombosis. *Cardiovasc Res*. 2021;117(1):29-42. doi: 10.1093/cvr/cvaa085.
- Donato A.J., Machin D.R., Lesniewski L.A. Mechanisms of Dysfunction in the Aging Vasculature and Role in Age-Related Disease. *Circ Res*. 2018;123(7):825-848. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312563.
- Bloom S.I., Islam M.T., Lesniewski L.A., Donato A.J. Mechanisms and consequences of endothelial cell senescence. *Nat Rev Cardiol*. 2023;20(1):38-51. doi: 10.1038/s41569-022-00739-0.
- Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Borisov V.V., Matveeva V.G., Antonova L.V., Filip'ev D.E., Golovkin A.S., Shishkova D.K., Burago A.Y., Frolov A.V., Dolgov V.Y., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Y., Vladimirov A.A., Sozinov S.A., Ismagilov Z.R., Russakov D.M., Lomzov A.A., Pysnyi D.V., Gutakovskiy A.K., Zhivodkov Y.A., Demidov E.A., Peltek S.E., Dolganyuk V.F., Babich O.O., Grigoriev E.V., Brusina E.B., Barbarash O.L., Yuzhalin A.E. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions. *Sci Rep*. 2016;6:27255. doi: 10.1038/srep27255.
- Shishkova D., Markova V., Sinitsky M., Tsepokina A., Velikanova E., Bogdanov L., Glushkova T., Kutikhin A. Calciprotein Particles Cause Endothelial Dysfunction under Flow. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8802. doi: 10.3390/ijms21228802.
- Shishkova D.K., Velikanova E.A., Bogdanov L.A., Sinitsky M.Y., Kostyunin A.E., Tsepokina A.V., Gruzdeva O.V., Mironov A.V., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Krivkina E.O., Matveeva V.G., Hryachkova O.N., Markova V.E., Dyleva Y.A., Belik E.V., Frolov A.V., Shabaev A.R., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Y., Kolmykov R.P., Sevostyanov O.G., Russakov D.M., Dolganyuk V.F., Gutakovskiy A.K., Zhivodkov Y.A., Kozhukhov A.S., Brusina E.B., Ismagilov Z.R., Barbarash O.L., Yuzhalin A.E., Kutikhin A.G. Calciprotein Particles Link Disturbed Mineral Homeostasis with Cardiovascular Disease by Causing Endothelial Dysfunction and Vascular Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22):12458. doi: 10.3390/ijms222212458.
- Shishkova D, Lobov A., Zainullina B., Matveeva V., Markova V., Sinitskaya A., Velikanova E., Sinitsky M., Kanonykina A., Dyleva Y., Kutikhin A. Calciprotein Particles Cause Physiologically Significant Pro-Inflammatory Response

- in Endothelial Cells and Systemic Circulation. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):14941. doi: 10.3390/ijms232314941.
20. Shishkova D., Lobov A., Repkin E., Markova V., Markova Y., Sinitskaya A., Sinitsky M., Kondratiev E., Torgunakova E., Kutikhin A. Calciprotein Particles Induce Cellular Compartment-Specific Proteome Alterations in Human Arterial Endothelial Cells. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2023;11(1):5. doi: 10.3390/jcdd11010005.
21. Sinitsky M., Repkin E., Sinitskaya A., Markova V., Shishkova D., Barbarash O. Proteomic Profiling of Endothelial Cells Exposed to Mitomycin C: Key Proteins and Pathways Underlying Genotoxic Stress-Induced Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2024;25(7):4044. doi: 10.3390/ijms25074044.
22. Faure E., Equils O., Sieling P.A., Thomas L., Zhang F.X., Kirschning C.J., Polentarutti N., Muzio M., Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000;275(15):11058-63. doi: 10.1074/jbc.275.15.11058.
23. Hansen C., Olsen K., Pilegaard H., Bangsbo J., Gliemann L., Hellsten Y. High metabolic substrate load induces mitochondrial dysfunction in rat skeletal muscle microvascular endothelial cells. *Physiol Rep.* 2021;9(14):e14855. doi: 10.14814/phy2.14855.
24. Verweij J., Kerpel-Fronius S., Stuurman M., van Triet A.J., van Hattum L., de Vries J., Pinedo H.M. Mitomycin C-induced organ toxicity in Wistar rats: a study with special focus on the kidney. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1988;114(2):137-41. doi: 10.1007/BF00417827.
25. Fang Y.P., Hu P.Y., Huang Y.B. Diminishing the side effect of mitomycin C by using pH-sensitive liposomes: in vitro characterization and in vivo pharmacokinetics. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:159-169. doi: 10.2147/DDDT.S150201.
26. Ferrucci L., Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(9):505-522. doi: 10.1038/s41569-018-0064-2.
27. Franceschi C., Garagnani P., Parini P., Giuliani C., Santoro A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(10):576-590. doi: 10.1038/s41574-018-0059-4.
28. Walker K.A., Basisty N., Wilson D.M. 3rd, Ferrucci L. Connecting aging biology and inflammation in the omics era. *J Clin Invest.* 2022;132(14):e158448. doi: 10.1172/JCI158448.
29. Violi F., Cammisotto V., Bartimoccia S., Pignatelli P., Carnevale R., Nocella C. Gut-derived low-grade endotoxaemia, atherothrombosis and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2023;20(1):24-37. doi: 10.1038/s41569-022-00737-2.
30. Wang B., Han J., Elisseeff J.H., Demaria M. The senescence-associated secretory phenotype and its physiological and pathological implications. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2024 Apr 23. doi: 10.1038/s41580-024-00727-x. Online ahead of print.
31. Libby P., Buring J.E., Badimon L., Hansson G.K., Deanfield J., Bittencourt M.S., Tokgözoğlu L., Lewis E.F. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):56. doi: 10.1038/s41572-019-0.
32. Sandoo A., van Zanten J.J., Metsios G.S., Carroll D., Kitas G.D. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J.* 2010;4:302-12. doi: 10.2174/1874192401004010302.
33. Cyr A.R., Huckaby L.V., Shiva S.S., Zuckerbraun B.S. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin.* 2020 =;36(2):307-321. doi: 10.1016/j.ccc.2019.12.009.
34. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
35. Farah C., Michel L.Y.M., Balligand J.L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(5):292-316. doi: 10.1038/nrcardio.2017.224.
36. Ryazanova M.A., Plekanchuk V.S., Prokudina O.I., Makovka Y.V., Alekhina T.A., Redina O.E., Markel A.L. Animal Models of Hypertension (ISIAH Rats), Catatonia (GC Rats), and Audiogenic Epilepsy (PM Rats) Developed by Breeding. *Biomedicines.* 2023;11(7):1814. doi: 10.3390/biomedicines11071814.
37. Higashi Y., Kihara Y., Noma K. Endothelial dysfunction and hypertension in aging. *Hypertens Res.* 2012;35(11):1039-47. doi: 10.1038/hr.2012.138.
38. Ambrosino P., Bachetti T., D'Anna S.E., Galloway B., Bianco A., D'Agnano V., Papa A., Motta A., Perrotta F., Maniscalco M. Mechanisms and Clinical Implications of Endothelial Dysfunction in Arterial Hypertension. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2022;9(5):136. doi: 10.3390/jcdd9050136.
39. Yap C., Mieremet A., de Vries C.J.M., Micha D., de Waard V. Six Shades of Vascular Smooth Muscle Cells Illuminated by KLF4 (Krüppel-Like Factor 4). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(11):2693-2707. doi: 10.1161/ATVBAHA.121.316600.
40. Lin P.K., Davis G.E. Extracellular Matrix Remodeling in Vascular Disease: Defining Its Regulators and Pathological Influence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2023;43(9):1599-1616. doi: 10.1161/ATVBAHA.123.318237.
41. Sutton N.R., Malhotra R., St Hilaire C., Aikawa E., Blumenthal R.S., Gackebach G., Goyal P., Johnson A., Nigwekar S.U., Shanahan C.M., Towler D.A., Wolford B.N., Chen Y. Molecular Mechanisms of Vascular Health: Insights From Vascular Aging and Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2023;43(1):15-29. doi: 10.1161/ATVBAHA.122.317332.
42. Pilard M., Ollivier E.L., Gourdou-Latzenok V., Coutraud F., Lemarié C.A. Endothelial Cell Phenotype, a Major Determinant of Venous Thrombo-Inflammation. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:864735. doi: 10.3389/fvrm.2022.864735.
43. Poredos P., Jezovnik M.K. Endothelial Dysfunction and Venous Thrombosis. *Angiology.* 2018;69(7):564-567. doi: 10.1177/0003319717732238.
44. Wang M., Hao H., Leeper N.J., Zhu L.; Early Career Committee. Thrombotic Regulation from the Endothelial Cell Perspectives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(6):e90-e95. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.310367.
45. Robles J.P., Zamora M., Adan-Castro E., Siqueiros-Marquez L., Martinez de la Escalera G., Clapp C. The spike protein of SARS-CoV-2 induces endothelial inflammation through integrin alpha5beta1 and NF-kappaB signaling. *J Biol Chem.* 2022;298(3):101695. doi: 10.1016/j.jbc.2022.101695.
46. Montezano A.C., Camargo L.L., Mary S., Neves K.B., Rios F.J., Stein R., Lopes R.A., Beattie W., Thomson J., Herder V., Szemiel A.M., McFarlane S., Palmarini M., Touyz R.M. SARS-CoV-2 spike protein induces endothelial inflammation via ACE2 independently of viral replication. *Sci Rep.* 2023;13(1):14086. doi: 10.1038/s41598-023-41115-3.
47. Winkler E.S., Bailey A.L., Kafai N.M., Nair S., McCune B.T., Yu J., Fox J.M., Chen R.E., Earnest J.T., Keeler S.P., Ritter J.H., Kang L.I., Dort S., Robichaud A., Head R., Holtzman M.J., Diamond M.S. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. *Nat Immunol.* 2020;21(11):1327-1335. doi: 10.1038/s41590-020-0778-2.
48. Dong W., Mead H., Tian L., Park J.G., Garcia J.I., Jaramillo S., Barr T., Kollath D.S., Coyne V.K., Stone N.E., Jones A., Zhang J., Li A., Wang L.S., Milanes-Yearsley M., Torrelles J.B., Martinez-Sobrido L., Keim P.S., Barker B.M., Caligiuri M.A., Yu J. The K18-Human ACE2 Transgenic Mouse Model Recapitulates Non-severe and Severe COVID-19 in Response to an Infectious Dose of the SARS-CoV-2 Virus. *J Virol.* 2022;96(1):e0096421. doi: 10.1128/JVI.00964-21.
49. Gao Y., Galis Z.S. Exploring the Role of Endothelial Cell Resilience in Cardiovascular Health and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(1):179-185. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314346.
50. Tombor L.S., Dimmeler S. Why is endothelial resilience key to maintain cardiac health? *Basic Res Cardiol.* 2022;117(1):35. doi: 10.1007/s00395-022-00941-8.

## REFERENCES

1. Cahill P.A., Redmond E.M. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016;248:97-109. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.
2. Trimm E., Red-Horse K. Vascular endothelial cell development and diversity. *Nat Rev Cardiol*. 2023;20(3):197-210. doi: 10.1038/s41569-022-00770-1.
3. Gimbrone M.A.Jr., García-Cardena .G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
4. Ungvari Z., Tarantini S., Kiss T., Wren J.D., Giles C.B., Griffin C.T., Murfee W.L., Pachter P., Csiszar A. Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(9):555-565. doi: 10.1038/s41569-018-0030-z.
5. Evans P.C., Rainger G.E., Mason J.C., Guzik T.J., Osto E., Stamataki Z., Neil D., Hoefler I.E., Fragiadaki M., Waltenberger J., Weber C., Bochaton-Piallat M.L., Bäck M. Endothelial dysfunction in COVID-19: a position paper of the ESC Working Group for Atherosclerosis and Vascular Biology, and the ESC Council of Basic Cardiovascular Science. *Cardiovasc Res*. 2020;116(14):2177-2184. doi: 10.1093/cvr/cvaa230.
6. Bonaventura A., Vecchié A., Dagna L., Martinod K., Dixon D.L., Van Tassell B.W., Dentali F., Montecucco F., Massberg S., Levi M., Abbate A. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(5):319-329. doi: 10.1038/s41577-021-00536-9.
7. Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Velikanova E.A., Sinitsky M.Y., Sinitskaya A.V., Markova V.E. Endothelial Dysfunction in the Context of Blood-Brain Barrier Modeling. *J Evol Biochem Physiol*. 2022;58(3):781-806. doi: 10.1134/S0022093022030139.
8. Segers V.F.M., Bringmans T., De Keulenaer G.W. Endothelial dysfunction at the cellular level in three dimensions: severity, acuteness, and distribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2023;325(2):H398-H413. doi: 10.1152/ajpheart.00256.2023.
9. Baaten C.C.F.M.J., Vondenhoff S., Noels H. Endothelial Cell Dysfunction and Increased Cardiovascular Risk in Patients With Chronic Kidney Disease. *Circ Res*. 2023;132(8):970-992. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.321752.
10. Kozlov S., Okhota S., Avtaeva Y., Melnikov I., Matroze E., Gabbasov Z. Von Willebrand factor in diagnostics and treatment of cardiovascular disease: Recent advances and prospects. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:1038030. doi: 10.3389/fevm.2022.1038030.
11. Okhota S., Melnikov I., Avtaeva Y., Kozlov S., Gabbasov Z. Shear Stress-Induced Activation of von Willebrand Factor and Cardiovascular Pathology. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):7804. doi: 10.3390/ijms21207804.
12. Avdonin P.P., Tsvetaeva N.V., Goncharov N.V., Rybakova E. Yu., Trufanov S.K., Tsitrina A.A., Avdonin P.V. Von willebrand factor in health and disease. *Biologiceskie membrany*. 2021;38(4):237-256. doi: 10.31857/S0233475521040034 (In Russian)
13. Alexander Y., Osto E., Schmidt-Trucksäss A., Shechter M., Trifunovic D., Duncker D.J., Aboyans V., Bäck M., Badimon L., Cosentino F., De Carlo M., Dorobantu M., Harrison D.G., Guzik T.J., Hoefler I., Morris P.D., Norata G.D., Suades R., Taddei S., Vilahur G., Waltenberger J., Weber C., Wilkinson F., Bochaton-Piallat M.L., Evans P.C. Endothelial function in cardiovascular medicine: a consensus paper of the European Society of Cardiology Working Groups on Atherosclerosis and Vascular Biology, Aorta and Peripheral Vascular Diseases, Coronary Pathophysiology and Microcirculation, and Thrombosis. *Cardiovasc Res*. 2021;117(1):29-42. doi: 10.1093/cvr/cvaa085.
14. Donato A.J., Machin D.R., Lesniewski L.A. Mechanisms of Dysfunction in the Aging Vasculature and Role in Age-Related Disease. *Circ Res*. 2018;123(7):825-848. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312563.
15. Bloom S.I., Islam M.T., Lesniewski L.A., Donato A.J. Mechanisms and consequences of endothelial cell senescence. *Nat Rev Cardiol*. 2023;20(1):38-51. doi: 10.1038/s41569-022-00739-0.
16. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Borisov V.V., Matveeva V.G., Antonova L.V., Filip'ev D.E., Golovkin A.S., Shishkova D.K., Burago A.Y., Frolov A.V., Dolgov V.Y., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Y., Vladimirov A.A., Sozinov S.A., Ismagilov Z.R., Russakov D.M., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Gutakovskiy A.K., Zhivodkov Y.A., Demidov E.A., Peltek S.E., Dolganyuk V.F., Babich O.O., Grigoriev E.V., Brusina E.B., Barbarash O.L., Yuzhalin A.E. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions. *Sci Rep*. 2016;6:27255. doi: 10.1038/srep27255.
17. Shishkova D., Markova V., Sinitsky M., Tsepokina A., Velikanova E., Bogdanov L., Glushkova T., Kutikhin A. Calciprotein Particles Cause Endothelial Dysfunction under Flow. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8802. doi: 10.3390/ijms21228802.
18. Shishkova D.K., Velikanova E.A., Bogdanov L.A., Sinitsky M.Y., Kostyunin A.E., Tsepokina A.V., Gruzdeva O.V., Mironov A.V., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Krivkina E.O., Matveeva V.G., Hryachkova O.N., Markova V.E., Dyleva Y.A., Belik E.V., Frolov A.V., Shabaev A.R., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Y., Kolmykov R.P., Sevostyanov O.G., Russakov D.M., Dolganyuk V.F., Gutakovskiy A.K., Zhivodkov Y.A., Kozhukhov A.S., Brusina E.B., Ismagilov Z.R., Barbarash O.L., Yuzhalin A.E., Kutikhin A.G. Calciprotein Particles Link Disturbed Mineral Homeostasis with Cardiovascular Disease by Causing Endothelial Dysfunction and Vascular Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22):12458. doi: 10.3390/ijms222212458.
19. Shishkova D, Lobov A., Zainullina B., Matveeva V., Markova V., Sinitskaya A., Velikanova E., Sinitsky M., Kanonykina A., Dyleva Y., Kutikhin A. Calciprotein Particles Cause Physiologically Significant Pro-Inflammatory Response in Endothelial Cells and Systemic Circulation. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23):14941. doi: 10.3390/ijms232314941.
20. Shishkova D., Lobov A., Repkin E., Markova V., Markova Y., Sinitskaya A., Sinitsky M., Kondratiev E., Torgunakova E., Kutikhin A. Calciprotein Particles Induce Cellular Compartment-Specific Proteome Alterations in Human Arterial Endothelial Cells. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2023;11(1):5. doi: 10.3390/jcdd11010005.
21. Sinitsky M., Repkin E., Sinitskaya A., Markova V., Shishkova D., Barbarash O. Proteomic Profiling of Endothelial Cells Exposed to Mitomycin C: Key Proteins and Pathways Underlying Genotoxic Stress-Induced Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2024;25(7):4044. doi: 10.3390/ijms25074044.
22. Faure E., Equils O., Sieling P.A., Thomas L., Zhang F.X., Kirschning C.J., Polentarutti N., Muzio M., Arditì M. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000;275(15):11058-63. doi: 10.1074/jbc.275.15.11058.
23. Hansen C., Olsen K., Pilegaard H., Bangsbo J, Gliemann L., Hellsten Y. High metabolic substrate load induces mitochondrial dysfunction in rat skeletal muscle microvascular endothelial cells. *Physiol Rep*. 2021;9(14):e14855. doi: 10.14814/phy2.14855.
24. Verweij J., Kerpel-Fronius S., Stuurman M, van Triet A.J., van Hattum L., de Vries J., Pinedo H.M. Mitomycin C-induced organ toxicity in Wistar rats: a study with special focus on the kidney. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1988;114(2):137-

41. doi: 10.1007/BF00417827.

25. Fang Y.P., Hu P.Y., Huang Y.B. Diminishing the side effect of mitomycin C by using pH-sensitive liposomes: in vitro characterization and in vivo pharmacokinetics. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:159-169. doi: 10.2147/DDDT.S150201.

26. Ferrucci L., Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(9):505-522. doi: 10.1038/s41569-018-0064-2.

27. Franceschi C., Garagnani P., Parini P., Giuliani C., Santoro A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(10):576-590. doi: 10.1038/s41574-018-0059-4.

28. Walker K.A., Basisty N., Wilson D.M. 3rd, Ferrucci L. Connecting aging biology and inflammation in the omics era. *J Clin Invest.* 2022;132(14):e158448. doi: 10.1172/JCI158448.

29. Violi F., Cammisotto V., Bartimoccia S., Pignatelli P., Carnevale R., Nocella C. Gut-derived low-grade endotoxaemia, atherothrombosis and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2023;20(1):24-37. doi: 10.1038/s41569-022-00737-2.

30. Wang B., Han J., Elisseeff J.H., Demaria M. The senescence-associated secretory phenotype and its physiological and pathological implications. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2024 Apr 23. doi: 10.1038/s41580-024-00727-x. Online ahead of print.

31. Libby P., Buring J.E., Badimon L., Hansson G.K., Deanfield J., Bittencourt M.S., Tokgözoğlu L., Lewis E.F. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):56. doi: 10.1038/s41572-019-0.

32. Sandoo A., van Zanten J.J., Metsios G.S., Carroll D., Kitas G.D. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J.* 2010;4:302-12. doi: 10.2174/1874192401004010302.

33. Cyr A.R., Huckaby L.V., Shiva S.S., Zuckerbraun B.S. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin.* 2020 =;36(2):307-321. doi: 10.1016/j.ccc.2019.12.009.

34. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.

35. Farah C., Michel L.Y.M., Balligand J.L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(5):292-316. doi: 10.1038/nrcardio.2017.224.

36. Ryazanova M.A., Plekanchuk V.S., Prokudina O.I., Makovka Y.V., Alekhina T.A., Redina O.E., Markel A.L. Animal Models of Hypertension (ISIAH Rats), Catatonia (GC Rats), and Audiogenic Epilepsy (PM Rats) Developed by Breeding. *Biomedicines.* 2023;11(7):1814. doi: 10.3390/biomedicines11071814.

37. Higashi Y., Kihara Y., Noma K. Endothelial dysfunction and hypertension in aging. *Hypertens Res.* 2012;35(11):1039-47. doi: 10.1038/hr.2012.138.

38. Ambrosino P., Bachetti T., D'Anna S.E., Galloway B., Bianco A., D'Agnano V., Papa A., Motta A., Perrotta F., Maniscalco M. Mechanisms and Clinical Implications of Endothelial Dysfunction in Arterial Hypertension. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2022;9(5):136. doi: 10.3390/jcdd9050136.

39. Yap C., Mieremet A., de Vries C.J.M., Micha D., de Waard V. Six Shades of Vascular Smooth Muscle Cells Illuminated by KLF4 (Kruppel-Like Factor 4). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*

2021;41(11):2693-2707. doi: 10.1161/ATVBAHA.121.316600.

40. Lin P.K., Davis G.E. Extracellular Matrix Remodeling in Vascular Disease: Defining Its Regulators and Pathological Influence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2023;43(9):1599-1616. doi: 10.1161/ATVBAHA.123.318237.

41. Sutton N.R., Malhotra R., St Hilaire C., Aikawa E., Blumenthal R.S., Gackebach G., Goyal P., Johnson A., Nigwekar S.U., Shanahan C.M., Towler D.A., Wolford B.N., Chen Y. Molecular Mechanisms of Vascular Health: Insights From Vascular Aging and Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2023;43(1):15-29. doi: 10.1161/ATVBAHA.122.317332.

42. Pilard M., Ollivier E.L., Gourdou-Latyszenok V., Couturaud F., Lemarié C.A. Endothelial Cell Phenotype, a Major Determinant of Venous Thrombo-Inflammation. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:864735. doi: 10.3389/fcvm.2022.864735.

43. Poredos P., Jezovnik M.K. Endothelial Dysfunction and Venous Thrombosis. *Angiology.* 2018;69(7):564-567. doi: 10.1177/0003319717732238.

44. Wang M., Hao H., Leeper N.J., Zhu L.; Early Career Committee. Thrombotic Regulation From the Endothelial Cell Perspectives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(6):e90-e95. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.310367.

45. Robles J.P., Zamora M., Adan-Castro E., Siqueiros-Marquez L., Martinez de la Escalera G., Clapp C. The spike protein of SARS-CoV-2 induces endothelial inflammation through integrin alpha5beta1 and NF-kappaB signaling. *J Biol Chem.* 2022;298(3):101695. doi: 10.1016/j.jbc.2022.101695.

46. Montezano A.C., Camargo L.L., Mary S., Neves K.B., Rios F.J., Stein R., Lopes R.A., Beattie W., Thomson J., Herder V., Szemiel A.M., McFarlane S., Palmarini M., Touyz R.M. SARS-CoV-2 spike protein induces endothelial inflammation via ACE2 independently of viral replication. *Sci Rep.* 2023;13(1):14086. doi: 10.1038/s41598-023-41115-3.

47. Winkler E.S., Bailey A.L., Kafai N.M., Nair S., McCune B.T., Yu J., Fox J.M., Chen R.E., Earnest J.T., Keeler S.P., Ritter J.H., Kang L.I., Dort S., Robichaud A., Head R., Holtzman M.J., Diamond M.S. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. *Nat Immunol.* 2020;21(11):1327-1335. doi: 10.1038/s41590-020-0778-2.

48. Dong W., Mead H., Tian L., Park J.G., Garcia J.I., Jaramillo S., Barr T., Kollath D.S., Coyne V.K., Stone N.E., Jones A., Zhang J., Li A., Wang L.S., Milanes-Yearsley M., Torrelles J.B., Martinez-Sobrido L., Keim P.S., Barker B.M., Caligiuri M.A., Yu J. The K18-Human ACE2 Transgenic Mouse Model Recapitulates Non-severe and Severe COVID-19 in Response to an Infectious Dose of the SARS-CoV-2 Virus. *J Virol.* 2022;96(1):e0096421. doi: 10.1128/JVI.00964-21.

49. Gao Y., Galis Z.S. Exploring the Role of Endothelial Cell Resilience in Cardiovascular Health and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(1):179-185. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314346.

50. Tombor L.S., Dimmeler S. Why is endothelial resilience key to maintain cardiac health? *Basic Res Cardiol.* 2022;117(1):35. doi: 10.1007/s00395-022-00941-8.

**Для цитирования:** Шишкова Д.К., Фролов А.В., Маркова В.Е., Маркова Ю.О., Канонькина А.Ю., Лазебная А.И., Матвеева В.Г., Торгунакова Е.А., Кутихин А.Г. Современные подходы к моделированию дисфункции эндотелия и системному поиску ее циркулирующих маркеров. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2024;13(3S): 173-190. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-3S-173-190

**To cite:** Shishkova D.K., Frolov A.V., Markova V.E., Markova Y.O., Kanonykina A.Yu., Lazebnaya A.I., Matveeva V.G., Torgunakova E.A., Kutikhin A.G. Modeling of endothelial dysfunction and search for its circulating biomarkers. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2024;13(3S): 173-190. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-3S-173-190